GUÍA DE USUARIO

applied biosystems® by life technologies™

Detección de *Salmonella* spp. en muestras de producción primaria por PCR en tiempo real

Aislamiento de ADN automatizado o mediante columna de centrifugación

para uso con:

PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit
PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K
MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit

Publication Number 100024642
Revision A

BY AFNOR CERTIFICATION NF VALIDATION EN ISO 16140

ABI 29/02 – 09/10
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS
FOR AGRIBUSINESS
www.afnor-validation.com

Para analizar muestras ambientales y de alimentos solamente.

life technologies™

La información contenida en esta guía está sujeta a cambios sin previo aviso.

DISCLAIMER

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

LIMITED USE LABEL LICENSE No. 492: Environmental Testing, Quality Control/Quality Assurance Testing, Food and Agricultural Testing

Notice to Purchaser: The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product (a) to perform internal research for the sole benefit of the purchaser; and (b) for environmental testing, quality control/quality assurance testing, food and agricultural testing, including reporting results of purchaser's activities in environmental testing, quality control/quality assurance testing, food and agricultural testing for a fee or other commercial consideration. No other right is hereby granted expressly, by implication, or by estoppel. This product is for environmental testing, quality control/ quality assurance testing, food and agricultural testing and research purposes only.

The purchase of this product does not grant the purchaser any additional rights, including (without limitation) the right to transfer or resell the product in any form or the right to use the product as a therapeutic agent or diagnostics test component. For information on obtaining additional rights, please contact outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

TRADEMARKS

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. NF Validation is a registered trademark of Association Française de Normalisation (AFNOR). Stomacher is a registered trademark of Seward Limited. Whirl-Pak is a registered trademark of Aristotle Corporation.

Translated from the English Pub. no. 4476867 Rev. B.

© 2014 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

Contenido

Acerca de esta guía 6

Historial de revisiones de la guía del usuario en inglés 6

CAPÍTULO 1 Introducción 7

Descripción 7
Destinatarios 7
Vida útil 7
Especificidad 7
NF Validation™ mediante certificación AFNOR 8
Fecha de caducidad 9
Condiciones operativas 9
Altitud 9
Definiciones de los términos 9
Flujo de trabajo 10

CAPÍTULO 2 PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit: *Salmonella* spp. 11

Introducción 11
Contenido del kit 11
Materiales no incluidos 12
Enriquecimiento previo de muestras de producción primaria 13
Homogeneización y enriquecimiento primario 13
Enriquecimiento secundario 13
Preparación de muestras automatizada mediante PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit 14
Preparar los materiales del kit PrepSEQ® 14
Preparar las placas de procesamiento de MagMAX™ Express-96 15
Procesar las muestras en el instrumento MagMAX™ Express-96 15
Solución de problemas 16

CAPÍTULO 3 PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K: *Salmonella* spp. 17

Introducción 17
Contenido del kit 17
Materiales no incluidos 18

Enriquecimiento previo de muestras de producción primaria 19
Antes de empezar 19
Homogeneización y enriquecimiento primario 19
Enriquecimiento secundario 19
Preparación de muestras mediante PrepSEQ Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K 19
Solución de problemas 22

CAPÍTULO 4 MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit 23

Introducción 23
Contenido del kit 23
Materiales no incluidos 24
Preparación para la PCR 25
Preparación de la PCR 25
Preparar los tubos para 7500 Fast, StepOne™ y StepOnePlus™ Systems 29
Procesar las reacciones 29
Antes de empezar 29
Procesar las reacciones de 8 tubos en el 7500 Fast System (solamente) sin RapidFinder™ Express Software 30
Ver los resultados 31
Introducción 31
Proceso general sin RapidFinder™ Express Software 31
Recursos para ver los resultados 31
Confirmación de los resultados 32
Solución de problemas 33

APÉNDICE A StepOne™ y StepOnePlus™ Systems 35

Procesar las reacciones de 8 tubos en StepOne™ System 35
Procesar las reacciones de 8 tubos en StepOnePlus™ System 36

APÉNDICE B Buenas Practicas de PCR 37

Evitar la contaminación y la amplificación no específica 37
Introducción 37
Buenas practicas de laboratorio para PCR 37
Sugerencias sobre la disposición de la placa 37

APÉNDICE C Seguridad 39

Seguridad química 40
Seguridad biológica 41

Documentación y asistencia 43

Obtener Hojas de Datos sobre Seguridad 43
Obtener certificados de análisis 43
Obtener asistencia 43
Asistencia sobre seguridad alimentaria 44
Garantía limitada del producto 44

Referencias 45

Acerca de esta guía

Historial de revisiones de la guía del usuario en inglés

Revisión	Fecha	Descripción
B	May 2014	• Texto sobre la certificación NF Validation™ actualizado para cumplir los requisitos más recientes. • Plantilla actualizada con actualizaciones asociadas a la información sobre la licencia de etiquetado de uso limitado, información sobre la garantía, la declaración sobre marca comercial y las declaraciones de seguridad.
A	November 2012	Nueva guía de usuario.

1 Introducción

¡IMPORTANTE! Antes de usar los productos descritos en esta guía, lea y entienda la información presentada en el apéndice "Seguridad" de este documento.

Descripción

Hemos desarrollado un flujo de trabajo de preparación de muestras para detectar *Salmonella* spp. en muestras de producción primaria. El flujo de trabajo incluye el enriquecimiento, la preparación de la muestra y la detección mediante PCR en tiempo real. Los siguientes métodos de preparación de muestras están disponibles para su uso en la detección de *Salmonella* spp. en muestras de producción primaria después del enriquecimiento:

- Método basado en microesferas magnéticas; consulte "PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit: Salmonella spp." en la página 11
- Método basado en columnas de centrifugación; consulte "PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K: Salmonella spp." en la página 17

Ambos métodos comparten un proceso de enriquecimiento en dos pasos antes de la purificación de la muestra.

Destinatarios

Los destinatarios del MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit son analistas de microbiología que tienen que realizar pruebas para detectar *Salmonella* spp. en muestras ambientales y de alimentos. El MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit no está destinado a ningún uso con fines terapéuticos o diagnósticos en animales o seres humanos.

Vida útil

Consulte la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta de la caja del envase.

Especificidad

El MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit puede detectar todas las especies de *Salmonella enterica* analizadas y no ha detectado ninguna especie que no sea *Salmonella*. El método no permite detectar *Salmonella bongori*.

NF Validation™ mediante certificación AFNOR

ABI 29/02 – 09/10
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
www.afnor-validation.com

PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit, PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K y MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit forman parte del flujo de trabajo de NF Validation™ para recuperar el ADN de *Salmonella* spp. a partir de caldos de cultivo de muestras ambientales que se suelen encontrar en la fase de producción primaria. La certificación usa el estándar ISO 16140 para validar métodos alternativos (métodos analíticos alternativos para el sector agrícola. Certificado por NF Validation™; **www.afnor-validation.com**). Este kit se comparó y se constató que era equivalente al método de referencia ISO 6579. El flujo de trabajo validado incluye lo siguiente:

- Uno de los kits de preparación de muestras siguientes:
  - PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit
  - PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K
- MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit
- Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrument
- RapidFinder™ Express Software

Método de referencia	Matriz
Se usaron dos métodos de referencia durante el estudio de validación: • NF EN ISO 6579:2002/Amd 1:2007: Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage (Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria) • NF U47-100: norma francesa sobre el aislamiento y la identificación de *Salmonella* spp. en el medioambiente y en muestras de productos animales: "Recherche par l'isolement et l'identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales" (detección mediante siembra en estrías de todos los serotipos de *Salmonella* en muestras de producción primaria)	Muestras ambientales: fundas para calzado (aves de corral y cerdos), heces (aves de corral y cerdos), basura, agua para consumo animal y esponjados

Observaciones y recomendaciones generales:

- Cumplir las prácticas óptimas de laboratorio (GLP, Good Laboratory Practices); consulte el estándar EN ISO 7218.
- Recomendamos que se sigan los estándares ISO 6579 e ISO 6887 para la preparación de "suspensiones maestras".
- En el contexto de la certificación NF Validation™, no se han analizado muestras de más de 25 gramos.

Fecha de caducidad

Para obtener más información acerca de la fecha de caducidad de la certificación NF Validation™, consulte el certificado, ABI 29/02 – 09/10, disponible en **www.afnor-validation.com** o en la sección Product Literature de la página del producto en **www.lifetechnologies.com**.

Condiciones operativas

Altitud

Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System solo se usa en interiores y en altitudes que no superen los 2000 m sobre el nivel del mar.

Requisitos de temperatura y humedad

Condición	Intervalo aceptable
Temperatura	15 a 30°C Cambio máximo inferior a 15°C cada 24 horas
Humedad	20 a 80 % de humedad relativa, sin condensación

Definiciones de los términos

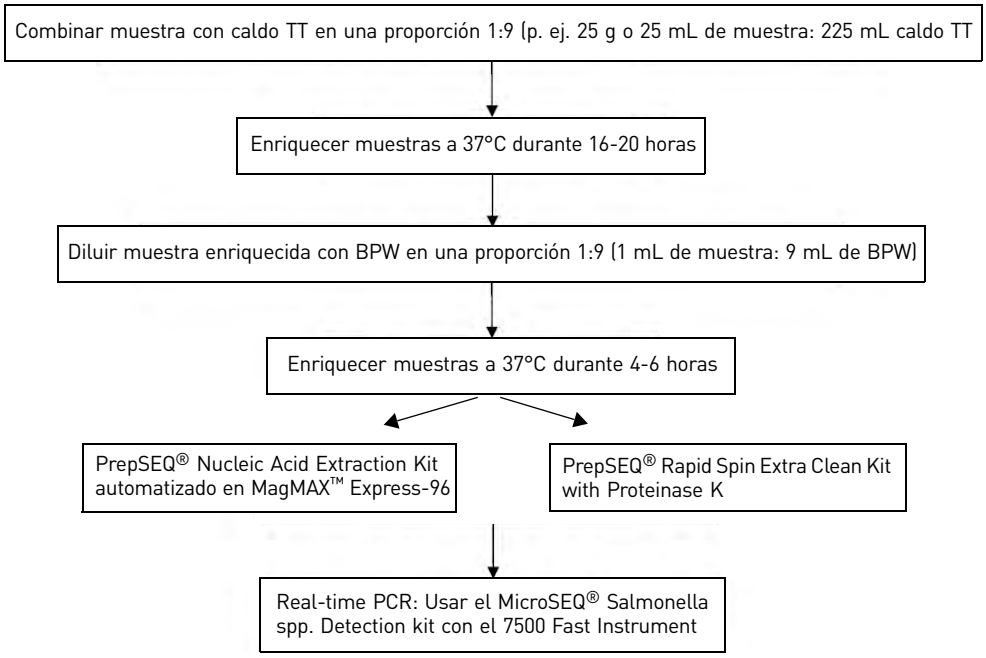
Este protocolo utiliza las siguientes convenciones:

- **Amplificación**: proceso de realizar copias y, por tanto, aumentar la cantidad, de una secuencia de ADN específica.
- **Control positivo interno (IPC, Internal Positive Control)**: control de todos los pocillos de reacciones que siempre deben producir amplificación. Si no es así, hay un problema con la amplificación. Se indica la presencia de un inhibidor en las muestras desconocidas si la señal de IPC se reduce de manera significativa.
- **Control negativo**: mezcla de reacciones sin secuencia objetivo. Indica contaminación si se produce una amplificación, o bien un problema de amplificación si la señal de IPC se reduce o no está. Se proporciona el Pathogen Detection Negative Control en el kit como control negativo. Se necesita un control negativo como mínimo para cada ensayo objetivo.
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction)**: tecnología que se usa para amplificar o aumentar la cantidad de una secuencia de ADN.
- **Control positivo**: control que establece la amplificación esperada de un objetivo. La ausencia de señal objetivo en un pocillo de control positivo indica un error de pipeteado o un problema con la amplificación. El investigador proporciona un control positivo y es recomendable, pero no obligatorio, para cada proceso.

- **Cebador o Primer**: segmento de ADN que complementa la secuencia de ADN objetivo o la secuencia de ADN del IPC. Se necesita para iniciar la amplificación.
- **Sonda**: segmento de ADN que complementa la secuencia de ADN objetivo o la secuencia de ADN del IPC. La sonda se etiqueta con un colorante reportero. Cuando la sonda se une al objetivo o el IPC durante el paso de la amplificación, se emite una fluorescencia. El Sequence Detection System (SDS) o el Real-Time PCR System detecta la fluorescencia, indicando la presencia de la secuencia de ADN objetivo o del IPC.
- **Objetivo**: bacteria que se está analizando.
- **Muestra desconocida**: muestra de ADN de una sustancia alimenticia que se analiza para detectar la presencia de uno o más patógenos alimentarios.

Flujo de trabajo

A continuación se muestra un flujo de trabajo de preparación de muestras para el método basado en microesferas magnéticas (consulte la página 11), así como el método basado en columnas de centrifugación (consulte la página 17).


Combinar muestra con caldo TT en una proporción 1:9 (p. ej. 25 g o 25 mL de muestra: 225 mL caldo TT
Enriquecer muestras a 37°C durante 16-20 horas
Diluir muestra enriquecida con BPW en una proporción 1:9 (1 mL de muestra: 9 mL de BPW)
Enriquecer muestras a 37°C durante 4-6 horas
PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit automatizado en MagMAX™ Express-96
PrepSEQ® Rapid Spin Extra Clean Kit with Proteinase K
Real-time PCR: Usar el MicroSEQ® Salmonella spp. Detection kit con el 7500 Fast Instrument

2 PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit: *Salmonella* spp.

Introducción

El PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit proporciona un método sencillo para preparar ADN a partir de muestras ambientales en la etapa de producción primaria. Este kit se ha validado para su uso con muestras ambientales en la etapa de producción primaria. El procedimiento implica lo siguiente:

- Enriquecimiento de *Salmonella* spp.*;* enriquecimiento primario en caldo de tetrationato (caldo TT) seguido de dilución y enriquecimiento secundario en agua de peptona tamponada (BPW, Buffered Peptone Water)
- Extracción automatizada de las muestras mediante el MagMAX™ Express-96 Magnetic Particle Processor

Se admiten las muestras iniciales recomendadas:

- Fundas para calzado y esponjas: de 100 a 150 mL de caldo TT
- Hisopos: 10 mL de caldo TT
- Otras muestras ambientales (como heces): caldo TT con una proporción 1:10; por ejemplo, 25 g de muestra con 225 mL de caldo TT

Contenido del kit

PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit
Cat. nos. 4480466 (100 reacciones), 4428176 (300 reacciones‡)

Artículo	Cantidad o volumen	Almacenamiento
Lysis Buffer	2 botellas, 50 mL/botella	Temperatura controlada (23±5°C)
Magnetic Particles	2 tubos, 1.5 mL/tubo	5±3°C
Binding Solution (isopropanol)	1 botella vacía	Temperatura controlada (23±5°C)
Wash Buffer Concentrate	2 botellas, 26 mL/botella	Temperatura controlada (23±5°C)
Elution Buffer	1 botella, 25 mL	Temperatura controlada (23±5°C)
Proteinase K (PK) Buffer	1 botella, 50 mL	Temperatura controlada (23±5°C)
Proteinase K (20 mg/mL)	1 botella, 1.25 mL	Inferior a –18°C

‡ El kit de 300 reacciones (Cat. no. 4428176) contiene el triple de cantidad/volumen mostrado en la tabla.

Nota: Los componentes se pueden enviar por separado en función de la configuración solicitada y las condiciones de almacenamiento.

Materiales no incluidos

En la tabla siguiente se incluyen los materiales y el equipo necesarios para usar (aunque no están incluidos) el PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit for Food Testing. A menos que se indique lo contrario, todos los materiales están disponibles en Life Technologies. MLS: Proveedor principal de productos de laboratorio (Major laboratory supplier).

Equipo, consumibles y reactivos	
Artículo	**Origen**
Equipo	
96-Well Magnetic Ring Stand	Cat. no. AM10050
Calentador de bloques o baño de agua (37-50°C)	MLS
Centrífuga de placas	Eppendorf 5804 o equivalente
MagMAX™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor	Cat. no. 4400079
Homogeneizador (mezclador de laboratorio Stomacher® 400)	Seward Cat. no. 0400/001/AJ o equivalente
Agitador	MLS
Consumibles	
Guantes desechables	MLS
Puntas de micropipeta, resistentes a los aerosoles	MLS
Pipetadores: • Desplazamiento positivo • Desplazamiento de aire • Varios canales	MLS
MagMAX™ Express-96 Deep Well Tip Combs	Cat. no. 4388487
MagMAX™ Express-96 Deep Well Plates	Cat. no. 4388476
MagMAX™ Express-96 Standard Plates	Cat. no. 4388475
Bolsas para filtros Whirl-Pak®, 15.2 cm × 22.9 cm (6" × 9"), 0.68 kg (24 oz.), 250/paq. (bolsas Stomacher® con malla)	Nasco Cat. no. BO1348WA o equivalente
Bolsas para filtros Whirl-Pak®, 15.2 cm × 22.9 cm (6" × 9"), 0.68 kg (24 oz.) (bolsas Stomacher® sin malla)	Nasco Cat. no. BO1297WA o equivalente

Equipo, consumibles y reactivos	
Artículo	**Origen**
Tubos de microcentrifugado, libre de PCR, de 1.5 mL	MLS
Tubos estériles de 15 o 50 mL	MLS
Reactivos	
Caldo de enriquecimiento de agua de peptona tamponada (BPW, Buffered Peptone Water)	MLS
Caldo de tetrationato (TT)	MLS
Nuclease-free Water	Cat. no. AM9938
Etanol al 95 %	MLS
Isopropanol al 100 %	• Fisher Chemical Cat. no. A464-1 • Sigma-Aldrich Cat. no. 190764-1L • O equivalente

Enriquecimiento previo de muestras de producción primaria

Homogeneización y enriquecimiento primario

1. Combine la muestra con caldo de tetrationato (caldo TT) con una proporción 1:9 en una bolsa para filtro Stomacher (Nasco WhirlPak Cat. no. B01488WA o equivalente); por ejemplo, combine 25 gramos de muestra con 225 mL de caldo TT.
2. Homogeneice la muestra en un mezclador de laboratorio Stomacher® 400 (o equivalente) durante 1 minuto aproximadamente a velocidad normal.
3. Incube a 37±1°C durante 16-20 horas en condiciones estáticas.

Enriquecimiento secundario

1. Diluya la muestra enriquecida con agua de peptona tamponada (BPW, Buffered Peptone Water) con una proporción 1:9; por ejemplo, 1 mL de muestra con 9 mL de BPW en un recipiente adecuado.
2. Incube la muestra a 37±1°C durante 5±1 horas en condiciones estáticas.
3. Mezcle brevemente la muestra para asegurarse de que las bacterias están en la solución; por ejemplo, agite durante unos 5 segundos.
4. Proceda a preparar la muestra.

   Nota: Se recomienda que se retengan las muestras de BPW para confirmar presuntos positivos. Almacene las muestras en frío a 5±3°C.

Preparación de muestras automatizada mediante PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit

¡IMPORTANTE! Use una técnica aséptica adecuada al manipular las muestras para impedir una contaminación cruzada.

Preparar los materiales del kit PrepSEQ®

1. Establezca la temperatura del calentador de bloques en 37°C.
2. **Binding Solution** (isopropanol): añada aproximadamente 35 mL de isopropanol al 100 % a la botella Binding Solution vacía. Etiquete la botella para indicar que se ha añadido isopropanol.
3. **Wash Buffer**: añada 74 mL de etanol al 95 % a una botella Wash Buffer Concentrate, mezcle bien y, a continuación, etiquete la botella para indicar que se ha añadido etanol.
4. **Magnetic Particles**: incube el tubo Magnetic Particles a 37±1°C durante 8±2 minutos y, a continuación, agítelo durante 10 segundos aproximadamente; manténgalo a una temperatura controlada (23±5°C) hasta que esté listo para su uso. Si después de la incubación inicial el precipitado de color blanco no se disuelve completamente, puede prolongarse el período de incubación y aumentarse las temperaturas (hasta 50°C) para conseguir el objetivo de disolver el precipitado.

   ¡IMPORTANTE! A veces se forma un precipitado de color blanco en el tubo Magnetic Particles. Los experimentos de extracción demuestran que la formación de precipitado no afecta al rendimiento siempre y cuando dicho precipitado se disuelva antes de su uso y las Magnetic Particles vuelvan a quedarse suspendidas. Antes de su uso, incube siempre el tubo Magnetic Particles a 37±1°C durante 10 minutos aproximadamente y, a continuación, agítelo para que vuelvan a quedarse suspendidas por completo. Si después de 10 minutos el precipitado de color blanco no se disuelve completamente, se recomienda prolongar el período de incubación, aumentar las temperaturas (≤50°C) y agitar el tubo para garantizar una resuspensión completa de las partículas.

   Nota: Las Magnetic Particles son el reactivo limitador del PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit. Asegúrese de que haya una cantidad suficiente de Magnetic Particles para el número de muestras que se van a procesar; se necesitan 25 µL de microesferas magnéticas por muestra.

5. **Binding Premix Solution**:
   a. Mezcle previamente 450 µL de PK Buffer con 325 µL de Binding Buffer y 25 µL de Magnetic Particles por muestra en un recipiente adecuado.

      Nota: Cuando prepare la Binding Premix Solution para varias muestras, multiplique los volúmenes por el número de muestras (incluidos los controles) más un 10 % adicional para la variación de muestreos.

      Nota: Use la Binding Premix Solution en el plazo de 1 hora tras su preparación. Guárdelo a una temperatura controlada.

   b. Para mezclarlo bien, agítelo durante 5 segundos aproximadamente hasta que finalice la resuspensión.

c. Añada 800 µL de Binding Premix Solution a cada pocillo de Lysis (muestra) Plate.

d. Cargue la placa en el instrumento cuando se lo indique el MagMAX™ Express-96 Magnetic Particle Processor.

Preparar las placas de procesamiento de MagMAX™ Express-96

1. Prepare las placas de procesamiento como se describe en la tabla siguiente. Añada reactivos a las placas como se describe en "Acción".

Placa	Tipo de placa MagMAX™ Express-96	Acción
Tip Plate	Standard	Coloque un Deep Well Tip Comb de 96 pocillos en una MagMAX Express-96 standard plate.
Elution Plate	Standard	Añada 120 µL de Elution Buffer por pocillo. **Nota:** Para incluir el control Elution Buffer, añada 120 µL de Elution Buffer a un pocillo vacío adicional de la Elution Plate.
Wash Plate I	Deep well (Cat. no. 4388476)	Añada 300 µL de Wash Buffer.
Wash Plate II	Deep well	Añada 300 µL de Wash Buffer.
Lysis (Sample) Plate	Deep well	Añada 100 µL de muestra de líquido BPW previamente enriquecido (del paso 4) del lado filtrado de la(s) bolsa(s) de cultivo de muestra enriquecida a la Lysis (Sample) Plate que contiene 800 µL de Binding Premix.

Procesar las muestras en el instrumento MagMAX™ Express-96

1. Seleccione el programa **4428176DWPrepSEQFA** en el MagMAX™ Express-96 Magnetic Particle Processor. Pulse **Start**.

2. Cargue las placas en el instrumento MagMAX™ Express-96 de acuerdo con la lectura. Verifique la orientación de cada placa {A1 a A1}.

Placa	Acción
Tip Plate	Cargue la Tip Plate y, a continuación, pulse **Start**.
Elution Plate	Cargue la Elution Plate preparada y, a continuación, pulse **Start**.
Wash Plate II	Cargue la Wash Plate II preparada y, a continuación, pulse **Start**.
Wash Plate I	Cargue la Wash Plate I preparada y, a continuación, pulse **Start**.
Lysis (Sample) Plate	Cargue la Lysis (Sample) Plate preparada y, a continuación, pulse **Start**.

Nota: No hay ningún paso más de interacción manual con el proceso automatizado hasta que el proceso haya finalizado el proceso de purificación.

3. Cuando haya terminado el proceso de preparación de la muestra, aparecerá el mensaje "Enjoy your DNA" en la pantalla. Extraiga la Elution Plate.

   Nota: La Elution Plate contiene el ADN purificado.

PUNTO DE PARADA Proceda con el proceso de PCR en tiempo real de MicroSEQ® *Salmonella* spp. (como se indica) o selle la Elution Plate con una película adhesiva transparente y guárdela a 5±3°C (una noche) o a menos de –18°C (a largo plazo).

Solución de problemas

Observación	Posible causa	Acción recomendada
La inhibición de la PCR se indica mediante la ausencia de detección de una reacción de IPC.	Las Magnetic Particles estaban en la Elution Plate.	No altere las Magnetic Particles durante la transferencia de ADN eluido al ensayo liofilizado. Opcional: Centrifuguela placa a 4000 × *g* durante 30 segundos aproximadamente para sedimentar las Magnetic Particles al fondo de la placa. *o* Coloque la Elution Plate en el 96-well magnetic ring stand (Cat. no. AM10050) durante la transferencia de muestras a un ensayo liofilizado.
	La Elution Plate contiene residuos de partículas que no se han eliminado totalmente de la muestra del alimento.	Evite que queden residuos durante la transferencia de ADN eluido al ensayo liofilizado. Opcional: Gire la placa a 4000 × *g* durante 30 segundos aproximadamente para sedimentar el residuo del alimento al fondo de la placa.

3 PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K: *Salmonella* spp.

Introducción

PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K proporciona un método sencillo para preparar ADN de muestras ambientales en la etapa de producción primaria para 100 reacciones. El PrepSEQ® Kit se ha validado para su uso con muestras ambientales en la etapa de producción primaria. El procedimiento del kit implica lo siguiente:

- Enriquecimiento de *Salmonella* spp.; enriquecimiento primario en caldo de tetrationato (caldo TT) seguido de dilución y enriquecimiento secundario en agua de peptona tamponada (BPW, Buffered Peptone Water)
- Preparación de muestras mediante columnas de centrifugación

Se admiten las muestras iniciales recomendadas:

- Fundas para calzado y esponjas: de 100 a 150 mL de caldo TT
- Hisopos: 10 mL de caldo TT
- Otras muestras ambientales (como heces): caldo TT con una proporción 1:10; por ejemplo, 25 g de muestra con 225 mL de caldo TT

Nota: Para preparar muestras a partir de muestras enriquecidas de producción primaria, recomendamos un volumen de muestra de 750 µL (cargada en la columna de centrifugación).

Contenido del kit

PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K (Cat. no. 4426715) contiene reactivos para 100 preparaciones de muestras.

Artículo	Cantidad o volumen	Almacenamiento
Columnas de centrifugación	100	Temperatura controlada (23±3°C)
Tubos de microcentrifugado, 1.5 mL	2 × 100	
Lysis Buffer, 1 botella	5 mL	5±3°C
Proteinase K (20 mg/mL), 1 tubo	1.25 mL	Inferior a –18°C

Nota: Los componentes se pueden enviar por separado en función de la configuración solicitada y las condiciones de almacenamiento.

Materiales no incluidos

En la tabla siguiente se incluyen los materiales y el equipo necesarios para usar (aunque no están incluidos) el PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K. A menos que se indique lo contrario, todos los materiales están disponibles en Life Technologies. MLS: Proveedor principal de productos de laboratorio (Major laboratory supplier).

Equipo, consumibles y reactivos	
Artículo	**Origen**
Equipo	
Calentador de bloques, 97°C	MLS
Calentador de bloques, 56°C	MLS
Gradilla para tubos de 1.5 mL	MLS
Microcentrífuga de sobremesa	Eppendorf 5415 D o equivalente
Homogeneizador (mezclador de laboratorio Stomacher® 400)	Seward Cat. no. 0400/001/AJ o equivalente
Pipetadores: • Desplazamiento positivo • Desplazamiento de aire	MLS
Agitador	MLS
Consumibles	
Guantes desechables	MLS
Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles	MLS
Bolsas para filtros Whirl-Pak®, 25.4 cm × 38.1 cm (10" × 15"), 2.6 kg (92 oz.), (bolsas Stomacher® con malla)	Nasco Cat. no. BO1488WA o equivalente
Bolsas para filtros Whirl-Pak®, 15.2 cm × 22.9 cm (6" × 9"), 0.68 kg (24 oz.), 250/paq. (bolsas Stomacher® con malla)	Nasco Cat. no. BO1348WA o equivalente
Bolsas Whirl-Pak®, 15.2 cm × 22.9 cm (6" × 9"), 0.68 kg (24 oz.) (bolsas Stomacher® sin malla)	Nasco Cat. no. BO1297WA o equivalente
Reactivos	
Agua de peptona tamponada (BPW, Buffered Peptone Water)	MLS
Caldo de tetrationato (TT)	MLS
Nuclease-free Water	Cat. no. AM9938

Enriquecimiento previo de muestras de producción primaria

Antes de empezar

Preparación de los reactivos para la preparación de las muestras

- Establezca la temperatura de un calentador de bloques en 97°C y, la de un segundo calentador de bloques, en 56°C.
- Etiquete los tubos de microcentrifugado de 1.5 mL.
- Para procesar varias muestras le recomendamos que prepare una mezcla Proteinase K-Lysis Buffer: mezcle previamente 5 µL de Proteinase K (20 mg/mL) con 50 µL de Lysis Buffer para cada muestra (use un recipiente limpio del tamaño adecuado para realizar la mezcla). Multiplique los volúmenes por el número de muestras más un 10 % de excedente. Mezcle bien para dispersar la Proteinase K en el Lysis Buffer. Úselo inmediatamente o almacénelo con hielo hasta que esté listo para su uso.

Homogeneización y enriquecimiento primario

1. Combine la muestra con caldo de tetrationato (caldo TT) con una proporción 1:9 en una bolsa para filtro Stomacher (Nasco WhirlPak Cat. no. B01488WA o equivalente); por ejemplo, combine 25 gramos de muestra con 225 mL de caldo TT.
2. Homogeneice la muestra en un mezclador de laboratorio Stomacher® 400 (o equivalente) durante 1 minuto aproximadamente a velocidad normal.
3. Incube a 37±1°C durante 16-20 horas en condiciones estáticas.

Enriquecimiento secundario

1. Diluya la muestra enriquecida con agua de peptona tamponada (BPW, Buffered Peptone Water) con una proporción 1:9; por ejemplo, 1 mL de muestra con 9 mL de BPW en un recipiente adecuado.
2. Incube la muestra a 37±1°C durante 5±1 horas en condiciones estáticas.
3. Mezcle brevemente la muestra para asegurarse de que las bacterias están en la solución; por ejemplo, agite durante unos 5 segundos.
4. Proceda a preparar la muestra.

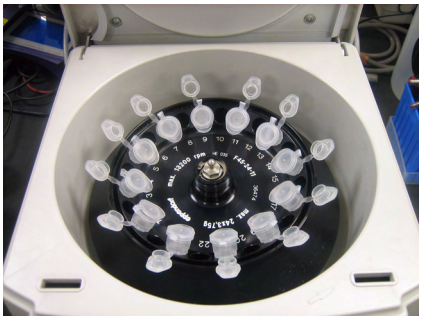
   Nota: Se recomienda que se retengan las muestras de BPW para confirmar presuntos positivos.

Preparación de muestras mediante PrepSEQ Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean with Proteinase K

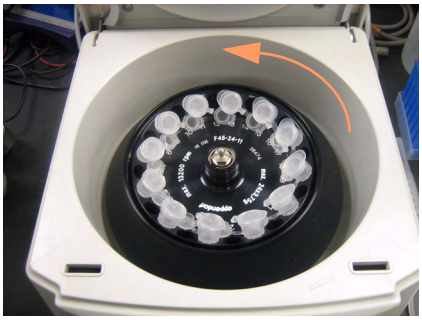
¡IMPORTANTE! Use una técnica aséptica adecuada al manipular las muestras para impedir una contaminación cruzada.

1. Inserte una columna de centrifugación en un tubo etiquetado.
2. Cargue 750 µL de muestra enriquecida en la columna de centrifugación y tape la columna.

3. Cargue el tubo con su columna de centrifugación en la microcentrífuga. Oriente la bisagra del tapón del tubo hacia el interior del rotor (vea la figura siguiente de la derecha). De lo contrario, la bisagra del tapón obstaculizará la instalación de la tapadera del rotor.



Posición incorrecta del tapón del tubo



Posición correcta del tapón del tubo

4. Microcentrifugue el tubo durante 3 minutos a 12000-16000 × *g*.
5. Saque el tubo de la microcentrífuga y, a continuación, deseche la columna de centrifugación usada.
6. Aspire el sobrenadante y, a continuación, deséchelo.

¡IMPORTANTE! Retire toda la cantidad de sobrenadante que sea posible, incluido el exceso de líquido de los laterales del tubo. Retire las gotas girando el pipetador en el interior del tubo y empujando el sobrenadante para retirarlo mediante aspiración.

---

7. Añada 55 µL de mezcla de Proteinase K-Lysis Buffer (50 µL de Lysis Buffer + 5 µL def Proteinase K) por muestra al sedimento.

   Nota: Consulte “Antes de empezar” en la página 19 para obtener instrucciones sobre cómo preparar una mezcla de Proteinase K-Lysis Buffer al procesar varias muestras.

¡IMPORTANTE! Almacene la mezcla de Proteinase K-Lysis Buffer con hielo hasta que esté lista para su uso.

---

8. Resuspenda pipeteando arriba y abajo o agite hasta que el sedimento quede bien disperso la mezcla de Lysis Buffer.
9. Transfiera la mezcla de Proteinase K-Lysis Buffer con el sedimento bacteriano resuspendido a un tubo limpio de 1.5 mL. El sedimento debe quedar bien disperso en el Lysis Buffer antes de llevar a cabo la transferencia.

¡IMPORTANTE! La mezcla de Proteinase K-Lysis Buffer se tiene que transferir a un tubo limpio. Durante la transferencia quedará grasa residual en los laterales del tubo original. Evite el contacto con la grasa y transfiera solo la mezcla de Proteinase K-Lysis Buffer que contiene el sedimento resuspendido a un tubo limpio.

---

10. Tape el tubo y, a continuación, incúbelo a 56±1°C durante 30 minutos aproximadamente para activar la Proteinase K.

11. Incúbelo a 97±2°C durante 10 minutos aproximadamente.
12. Deje que se enfríe la muestra durante 2 minutos aproximadamente a temperatura controlada.
13. Microcentrifugue el tubo durante 1 minuto a 12000-16000 × *g* para reducir la condensación después del paso de calentamiento a 97±2°C.
14. Añada 250 µL de Nuclease-free Water. Mezcle bien.

¡IMPORTANTE! Use Nuclease-free Water (Cat. no. AM9938). El agua esterilizada en autoclave no debe considerarse libre de PCR.

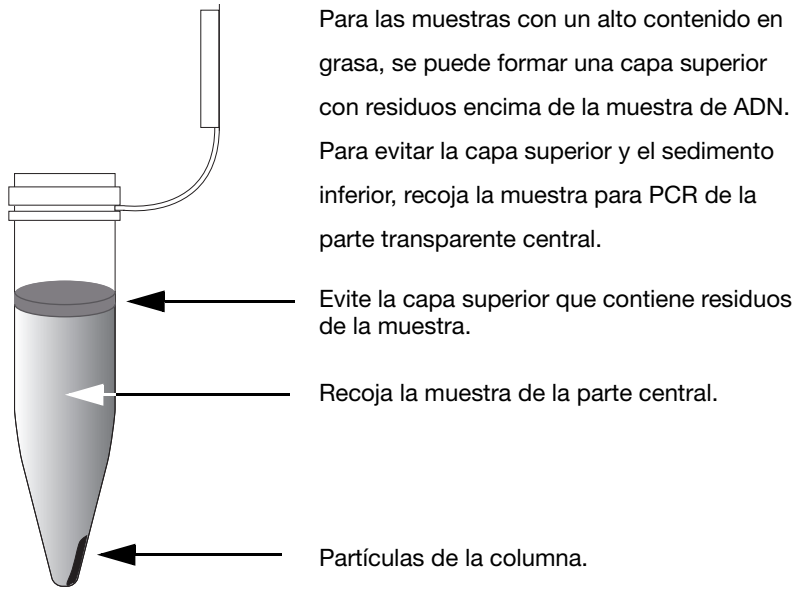
---

15. Microcentrifugue el tubo durante 90±30 segundos a 12000-16000 × *g* para hacer bajar las partículas derivadas de la columna de centrifugación, que pueden interferir con la amplificación. El ADN microbiano está en la fase acuosa.

    Nota: Las muestras se pueden almacenar a 5±3°C durante una noche, o a menos de –18°C durante un plazo de tiempo prolongado. Antes de procesar la PCR, deben centrifugarse las muestras almacenadas durante 1 minuto aproximadamente a velocidad máxima para sedimentar las partículas de la columna.
16. Proceda con la PCR o almacene el tubo a una temperatura inferior a –18°C.

¡IMPORTANTE! Use 30 µL de sobrenadante para la PCR en el ensayo liofilizado. Para obtener instrucciones detalladas, consulte el protocolo de MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit (consulte "MicroSEQ® Salmonella spp. Detection Kit" en la página 23).

¡IMPORTANTE! Si se produce la inhibición de la PCR, según lo indica la ausencia de amplificación para el objetivo o el IPC, diluya la muestra con agua. Se recomienda añadir 5 µL de muestra y 25 µL de agua al ensayo liofilizado para superar la inhibición. Consulte "Solución de problemas" en la página 22 para obtener información detallada.


Para las muestras con un alto contenido en grasa, se puede formar una capa superior con residuos encima de la muestra de ADN. Para evitar la capa superior y el sedimento inferior, recoja la muestra para PCR de la parte transparente central.
Evite la capa superior que contiene residuos de la muestra.
Recoja la muestra de la parte central.
Partículas de la columna.

Solución de problemas

Observación	Posible causa	Acción recomendada
Inhibición de la PCR, indicada mediante la ausencia de detección de una reacción de IPC.	La retirada del sobrenadante antes de añadir Lysis Buffer no fue suficiente.	Diluya la muestra 1:5 o 1:10 con Nuclease-free Water para diluir los inhibidores de la PCR. Si se mantiene la PCR inhibida, repita la preparación de la muestra.
	El material filtrado de la columna de centrifugación se encuentra en la muestra. El material filtrado con partículas puede inhibir la PCR.	Centrifugue la muestra para separar las partículas del material filtrado antes de transferir la muestra a la reacción de la PCR.
	Matriz asociada a componentes inhibitorios de la PCR. Como las heces son heterogéneas y variables según sus orígenes, hay una alta probabilidad de que surjan complicaciones. Este paso ofrece una solución para ayudar a retirar componentes inhibitorios de la PCR.	Lave previamente el sedimento bacteriano antes de cargar la columna Rapid Spin: 1 - Transfiera 750 µL de muestra a un tubo de microcentrifugado limpio. 2 - Centrifugue a 12000-16000 × *g* durante 3 min. 3 - Deseche el sobrenadante. 4 - Resuspenda el sedimento en 650 µL de agua destilada estéril. 5 - Cargue la muestra resuspendida en la columna Rapid Spin.
El sedimento bacteriano se separa del tubo, por lo que resulta difícil evitar el sedimento durante la aspiración.	La muestra no se supervisó antes de aspirar el sobrenadante, lo que hizo que se disipara el sedimento bacteriano.	Vuelva a centrifugar el sobrenadante y retírelo inmediatamente después de la centrifugación.
	El tamaño del sedimento bacteriano es muy reducido y difícil de ver.	Retire el sobrenadante con cuidado, dejando hasta 50 µL de dicho sobrenadante, para evitar la aspiración del sedimento.

4 MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit

Introducción

El MicroSEQ® *Salmonella* spp. Real-Time PCR Detection Kit se ha validado para su uso con muestras de producción primaria.

Contenido del kit

El MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit (Cat. no. 4403930) contiene reactivos para 96 reacciones. Los componentes del kit y sus condiciones de almacenamiento se muestran en la tabla siguiente.

Nombre	Descripción	Color del tapón	Almacena-miento
MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit	*Salmonella* spp. Assay Beads, 96 tubos en tiras de 8 tubos (96 reacciones/kit), doce tiras de 8 tubos	Verde (gradilla)	5±3°C; proteger de la luz y la humedad‡
	MicroAmp® Optical 8-Cap Strips, doce tiras de 8 tubos	N/A	
Pathogen Detection Negative Control	Pathogen Detection Negative Control, 1 tubo, 1.5 mL	Rojo	5±3°C

‡ Una exposición excesiva a la luz puede afectar a las sondas fluorescentes. Para proteger las tiras de 8 tubos de la humedad, selle la bolsa herméticamente cada vez que saque una tira de la bolsa.

Nota: Los componentes se pueden enviar por separado en función de la configuración y las condiciones de almacenamiento.

Materiales no incluidos

En la tabla siguiente se incluyen los materiales y el equipo necesarios para usar (aunque no están incluidos) el MicroSEQ® *Salmonella* spp. Detection Kit. A menos que se indique lo contrario, todos los materiales están disponibles en Life Technologies. MLS: Proveedor principal de productos de laboratorio (Major laboratory supplier).

Instrumentos, equipo, consumibles y reactivos‡	
Artículo	**Origen**
Instrumentos	
Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System	Póngase en contacto con su representante local de Life Technologies.
StepOne™ Real-Time PCR System	
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	
Equipo	
Microcentrífuga de sobremesa	Eppendorf 5415D o equivalente
Calentador de bloques	MLS
Cubo de hielo	MLS
Centrífuga de placas	Eppendorf 5804 o equivalente
Agitador	MLS
7500 Fast Precision Plate Holder for MicroAmp® Tube Strips (para usar con 7500 Fast Real-Time PCR System§)	Cat. no. 4403809
MicroAmp® Fast 48-Well Tray (para usar con StepOne™ Real-Time PCR System)	Cat. no. 4375282
MicroAmp® 96-Well Tray for Veriflex™ Blocks (para usar con StepOnePlus™ Real-Time PCR System)	Cat. no. 4379983
MicroAmp® 96-Well Base	Cat. no. N8010531
Pipetadores: • Desplazamiento positivo • Desplazamiento de aire • Varios canales	MLS
Consumibles	
Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles	MLS
Guantes desechables	MLS
MicroAmp® Multi-removal Tool	Cat. no. 4313950
MicroAmp® Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL	Cat. no. 4358293
MicroAmp® Optical 8-Cap Strip, 300 tiras	Cat. no. 4323032
Reactivos	
Nuclease-free water	Cat. no. AM9938

‡ Los materiales incluidos aquí se han validado para su uso con este kit. Los resultados pueden variar si se usan productos sustitutos de otros proveedores.

§ Incluido en el kit básico

Preparación para la PCR

Para preparar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debe crear un documento de archivo de proceso y preparar las microesferas y muestras del ensayo. El procedimiento exacto depende de si va a usar o no RapidFinder™ Express Software. Life Technologies recomienda utilizar el 7500 Fast Real-Time PCR System con RapidFinder™ Express Software; consulte "StepOne™ y StepOnePlus™ Systems" en la página 35 para obtener información acerca del procesamiento de reacciones usando otros instrumentos. Este protocolo describe el procedimiento que no usa RapidFinder™ Express Software. Recomendamos que se utilice RapidFinder Express Software para obtener instrucciones detalladas en línea destinadas a configurar los ensayos y realizar un análisis de datos automatizado después.

¡IMPORTANTE! Si usa RapidFinder™ Express Software, consulte las instrucciones que aparecen en los apartados "Create or Edit Run File" y "Pipette Samples" de la *RapidFinder™ Express Software Online Help* (Pub. no. 4401842).

Preparación de la PCR

Crear un documento de archivo de proceso

1. En el Sequence Detection System Software, cree un documento de archivo de proceso: En la lista desplegable Assay, seleccione **Absolute Quantification** (**Standard Curve**). Para obtener información acerca de la creación de un documento de archivo de proceso, consulte la documentación proporcionada con su instrumento.
2. Con el Quencher Dye establecido como (**none**) o (**Non Fluorescent**), cree o seleccione los detectores de colorante FAM™ y VIC®.
3. Asocie los detectores FAM™ y VIC® a cada reacción.

   Nota: El colorante FAM se usa para detectar el objetivo, mientras que el colorante VIC sirve para detectar el control positivo interno (IPC).
4. Establezca las condiciones de termociclado según se indica en la tabla siguiente. Para obtener más información, consulte la *7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System Absolute Quantitation Using Standard Curve Getting Started Guide* (Pub. no. 4347825) o la *StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Presence/Absence Experiments Getting Started Guide (Pub. no. 4376787).*

Para instrumentos 7500 Fast

Paso	**Activación enzimática**	**PCR**	
	HOLD	Cycle (40 cycles)	
		Desnaturalización	Puesta al rojo vivo/extensión
Temp.	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	3 s	30 s

Para instrumentos StepOne™ y StepOnePlus™
(no incluidos en estudios de validación AOAC o AFNOR)

Paso	**Activación enzimática**	**PCR**	
	HOLD	Cycle (40 cycles)	
		Desnaturalización	Puesta al rojo vivo/ extensión
Temp.	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	1 s	20 s

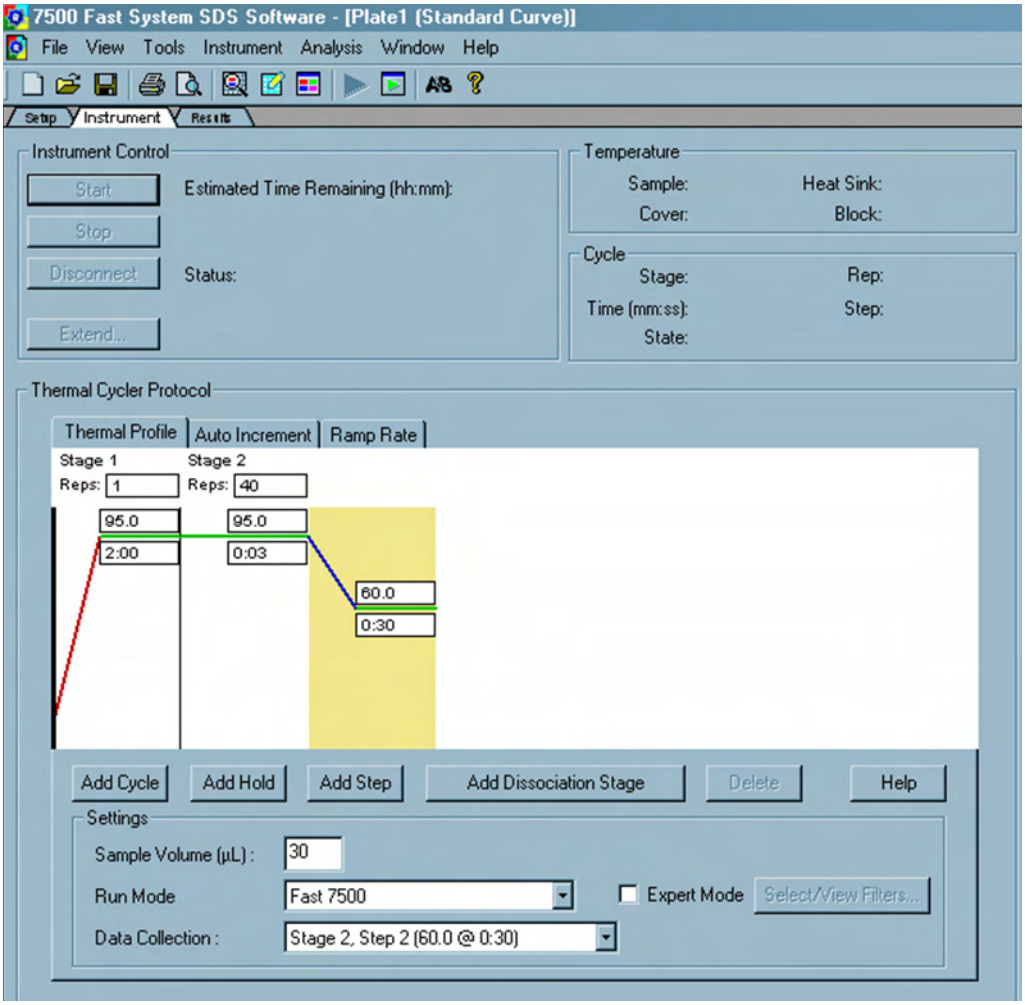
5. Establezca Sample Volume en **30** µL.

6. Seleccione el modo de ejecución adecuado para su sistema según la tabla siguiente:

Sistema	**Modo de ejecución**
7500 Fast‡	Fast 7500
StepOne™	Fast
StepOnePlus™	Fast

‡ La Figura 1 muestra un ejemplo de la ficha Instrument del 7500 Fast System SDS Software.

Figura 1 Ficha Instrument del 7500 Fast System SDS Software con el modo de ejecución establecido en Fast 7500.



Preparar las microesferas del ensayo

1. Abra la bolsa de almacenamiento que contiene las microesferas del ensayo (realice un corte por la marca situada en la esquina superior de la bolsa de almacenamiento, por encima de la tira de cierre hermético Ziplock).

   ¡IMPORTANTE! No extraiga el desecante de la bolsa de almacenamiento.

2. Retire la cantidad adecuada de tubos individuales o tiras de 8 tubos (un tubo por cada reacción que piense procesar).
3. Coloque los tubos en hielo o en un bloque frío.
4. Selle la bolsa de almacenamiento mediante la tira de cierre hermético Ziplock y, a continuación, guárdela a una temperatura de 5±3°C.

Preparar las muestras y los controles

1. Coloque las muestras y los controles en hielo o en un bloque frío. Descongele totalmente.

   ¡IMPORTANTE! Los reactivos se deben descongelar en hielo o en un bloque frío.

2. Retire la condensación después de descongelar las muestras y antes de abrirlas para evitar la contaminación cruzada.
   a. Para las muestras de PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit, centrifugue la placa a 1000-2000 × *g* durante 90±30 segundos.
   b. Para las muestras de PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit, microcentrifugue los tubos a 12000-16000 × *g* durante 90±30 segundos para hacer bajar las partículas derivadas de la columna de centrifugación, que pueden interferir con la amplificación. El ADN microbiano está en la fase acuosa.
   c. Para el Pathogen Detection Negative Control y el control o los controles positivos de los tubos de microcentrifugado, agite y, a continuación, centrifugue los tubos.

   Nota: El investigador proporciona muestras desconocidas y muestras de controles positivos. El kit incluye un control negativo (Pathogen Detection Negative Control).

3. Añada 30 µL de la muestra preparada anteriormente a cada microesfera del ensayo. Dispense todas las muestras desconocidas primero y, después, el control o los controles negativos y el control o los controles positivos. Las microesferas se disuelven en un plazo de 1 a 5 segundos. Para realizar la mezcla, aspire suavemente y dispense varias veces. (También se pueden agitar los tubos de ensayo después de taparlos en el paso final.)

   ¡IMPORTANTE! Use una nueva punta de pipeta para cada muestra. Resuspenda pipeteando con cuidado arriba y abajo con la punta de pipeta situada en el fondo del tubo para minimizar la formación de aerosol y la contaminación cruzada o, si hay un agitador disponible, agite los tubos tapados hasta que se disuelva el sedimento.

   Nota: Añada 30 µL de muestra de PrepSEQ® Rapid Spin Kit o 30 µL de muestra de PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit a cada microesfera del ensayo. El PrepSEQ® Rapid Spin Kit proporciona 300 µL de muestra, y el PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit proporciona ~100 µL de muestra. Use 30 µL de Pathogen Detection Negative Control por reacción de control negativo. Si usa otros métodos de preparación de muestras, y hay menos de 30 µL de muestra disponible, ajuste el volumen de la muestra con agua hasta alcanzar los 30 µL para cada tipo de reacción.

   ¡IMPORTANTE! Tape los tubos, sellando cada uno con los tapones ópticos transparentes dispuestos en tiras suministrados en el kit. No use tapones ni tubos de colores para las reacciones del kit. Los tapones o tubos de colores pueden afectar a las lecturas de señales de los colorantes durante la PCR en tiempo real.

Nota: Las microesferas del ensayo contienen todos los componentes necesarios para cada reacción.

Preparar los tubos para 7500 Fast, StepOne™ y StepOnePlus™ Systems

Las tiras de 8 tubos (con las microesferas del ensayo) suministradas son compatibles con 7500 Fast, StepOne™ y StepOnePlus™ Systems. Para obtener información acerca del uso de StepOne™ y StepOnePlus™ Systems, consulte Apéndice A en la página 35.

1. Para las tiras de 8 tubos con siete reacciones o menos, añada más tubos vacíos según sea necesario para que cada tira tenga un conjunto completo de 8 tubos.

   Nota: Las tiras de 8 tubos distribuyen uniformemente la carga de sujeción que se aplica a las tiras de tubos de muestras durante el procesamiento y, por tanto, se minimizará el riesgo de caída de los tubos. Añada tubos vacíos según sea necesario hasta formar una tira completa de 8 tubos en una columna (vea la figura de la página siguiente).

2. Tape los tubos, sellando cada uno con los tapones ópticos transparentes dispuestos en tiras suministrados en el kit. Tape los tubos con los tapones para tiras mediante el MicroAmp® 96-Well Base (Cat. no. N8010531) y la MicroAmp® Cap Installing Tool (Cat. no. 4330015) para evitar que los tubos se caigan, se doblen o queden mal alineados. Confirme que las tiras están rectas y que cada tubo esté alineado con el tubo adyacente.

3. Asegúrese de que las reacciones queden bien mezcladas.

   ¡IMPORTANTE! La mezcla se puede llevar a cabo pipeteando con cuidado arriba y abajo. Mantenga la punta de la pipeta en el fondo del tubo para minimizar la formación de aerosol y la contaminación cruzada o, si hay un agitador disponible, úselo para mezclar los componentes del tubo de ensayo.

4. Asegúrese de que los reactivos estén en el fondo de los tubos. Si hay una centrífuga con adaptador de placas disponible, úsela para centrifugar el contenido de los tubos a 2000 × *g* durante unos 20 segundos.

Procesar las reacciones

El procesamiento de tubos o de una placa implica el uso de un Applied Biosystems® Sequence Detection System (SDS) o un Real-Time PCR System para el análisis de muestras. El procedimiento exacto depende de si va a usar o no RapidFinder™ Express Software. Este protocolo describe el procedimiento que no usa RapidFinder Express Software. Recomendamos que se utilice RapidFinder™ Express Software para obtener instrucciones detalladas en línea destinadas a configurar los ensayos y realizar un análisis automatizado de los datos después.

¡IMPORTANTE! Si usa RapidFinder™ Express Software, consulte las instrucciones que aparecen en el apartado "Start Instrument Run" de la *RapidFinder™ Express Software Online Help* (Pub. no. 4401842).

Antes de empezar

Asegúrese de que el instrumento esté bien instalado y calibrado. Para obtener información sobre la calibración, consulte la documentación proporcionada con su instrumento.

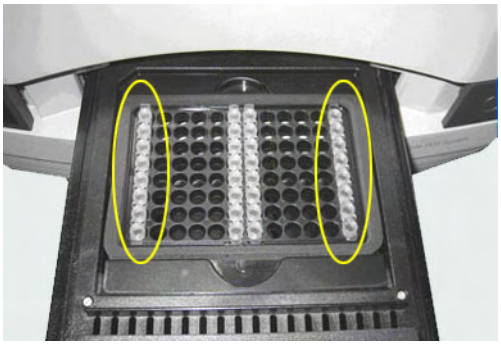
Procesar las reacciones de 8 tubos en el 7500 Fast System (solamente) sin RapidFinder™ Express Software

Para las tiras de 8 tubos del 7500 Fast System:

Se recomienda utilizar el 7500 Fast Precision Plate Holder para MicroAmp® Tube Strips (Cat. no. 4403809).

Cuando use las tiras de 8 tubos de MicroAmp, si no se usan la columna 1 (situada en el extremo izquierdo) y la columna 12 (situada en el extremo derecho), inserte dos tiras de 8 tubos vacíos y totalmente tapados en estas columnas.

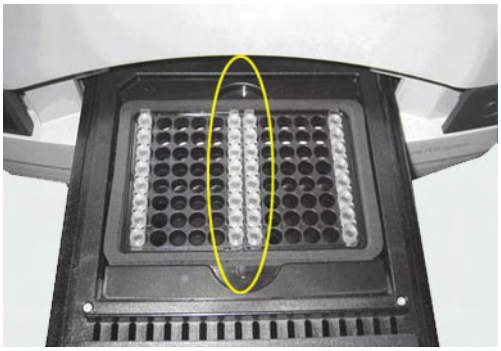
Nota: Las tiras de 8 tubos vacíos y tapados distribuyen uniformemente la carga de sujeción que se aplica a las tiras de tubos de muestras durante el procesamiento y, por tanto, se minimizará el riesgo de caída de los tubos.



1. Inserte con cuidado dos o más tiras de 8 tubos con muestras, empezando desde el centro del reposaplacas y desplazándose hacia fuera. Esta disposición minimiza la posibilidad de que las tiras de tubos se doblen o queden mal alineadas.

   Nota: Se puede procesar un mínimo de dos y un máximo de doce tiras de 8 tubos a la vez. Si hay un número impar de muestras en los tubos de la tira, tendrá que incluir una tira de 8 tubos vacíos y tapados para equilibrar la carga.

   ¡IMPORTANTE! Use siempre un total de 8 tubos por columna. Puede que sea necesario añadir tubos nuevos y vacíos a una columna.



2. Abra el documento del archivo de proceso correspondiente a la placa de reacción creada en “Crear un documento de archivo de proceso” en la página 25.

3. Inicie el proceso.

¡IMPORTANTE! Para evitar que se produzcan falsos positivos debido a material amplificado en su área de trabajo, no abra los tubos después de la amplificación.

Ver los resultados

Introducción

El modo de visualización de los resultados dependerá del instrumento que use. Consulte la guía de usuario adecuada de su instrumento de PCR en tiempo real o del *RapidFinder™ Express Software Online Help* para obtener instrucciones sobre cómo analizar los datos y ver los resultados.

¡IMPORTANTE! Si usa RapidFinder™ Express Software, consulte las instrucciones que aparecen en el apartado "Viewing Results" de la *RapidFinder™ Express Software Online Help* (Pub. No. 4401842).

Proceso general sin RapidFinder™ Express Software

El proceso general para ver los resultados desde los MicroSEQ® Pathogen Detection Kits implica lo siguiente:

- Visualización de las gráficas de amplificación de todas las reacciones.
- Definición de valores de umbral y línea de base.
- Comprobación de la señal de colorante FAM™ (específica del objetivo) y una señal de colorante VIC® (IPC) de cada muestra. En la tabla siguiente hay una guía básica para interpretar los resultados:

Señal de colorante FAM™ (objetivo)	Señal de colorante VIC® (IPC)	Resultado
+	+, –	Positivo
–	+	Negativo
–	–	Consulte "Solución de problemas" en la página 33.

Recursos para ver los resultados

Para obtener más información acerca del análisis de los datos, consulte:

- La guía de usuario del instrumento adecuado
- *RapidFinder™ Express Software Online Help* (Pub. no. 4401842)

Recomendamos que no se use el mismo método para cribar las muestras y confirmar los resultados. Cuando use el MicroSEQ® Pathogen Detection System para cribar las muestras, se recomienda aplicar métodos de cultivo y bioquímica para confirmar el resultado. Consulte la muestra de BPW enriquecida ("Enriquecimiento secundario" en la página 13 y siga el ISO 6579:2002 (E), un protocolo aprobado para confirmar las pruebas de cultivos (consulte "Referencias" en la página 45).

Confirmación de los resultados

En el contexto de NF Validation, todas las muestras identificadas como positivas por el método MicroSEQ® *Salmonella* spp. se deben confirmar, a partir del caldo de enriquecimiento BPW, mediante una de las pruebas siguientes:

- Según las pruebas clásicas descritas en los métodos normalizados por CEN ISO o NF U47-100. El paso de confirmación debe empezar a partir del caldo de enriquecimiento BPW.
- Realizando un segundo paso de enriquecimiento en el caldo de peptona de soja de Rappaport-Vassiliadis (RVS, Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone) (0.1 mL de BPW en 10 mL de caldo RVS): incube a 41.5±1°C durante 24±3 h y realice una siembra en estrías en el agar XLD (xilosa, lisina, desoxicolato) u otra placa de agar selectiva. A continuación, realice una prueba Latex a las colonias características observadas o cree una galería bioquímica de las colonias purificadas características de la *Salmonella*.
- Cualquier otro método con la certificación "NF Validation" que se base en un principio diferente al método MicroSEQ® *Salmonella* spp. Es necesario que se aplique todo el protocolo completo del segundo método validado, lo que significa que todos los pasos anteriores al paso de confirmación deben ser comunes a ambos métodos.

En caso de que se obtengan resultados discordantes (positivos con el método alternativo, no confirmados por uno de los medios descritos anteriormente), el laboratorio debe seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.

Solución de problemas

Observación	Posible causa	Acción
No se ha detectado ninguna señal (específica del IPC o del objetivo) en pocillos desconocidos.	Se ha producido la inhibición de la PCR.	Diluya la muestra 1:5 o 1:10 con Nuclease-free Water para diluir los inhibidores de la PCR y repetir el ensayo. Si se mantiene la PCR inhibida, repita la preparación de la muestra. Para obtener más información, consulte la sección "Solución de problemas" del PrepSEQ® Nucleic Acid Extraction Kit Protocol en la página 16, PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kit Protocol en la página 22.
No se ha detectado ninguna señal específica del objetivo en los pocillos de control positivo.	Se ha producido un error de pipeteado (no se ha añadido un control positivo).	Repita el ensayo. Asegúrese de pipetear el control positivo en todos los pocillos de control positivo.
No se ha detectado ningún IPC, pero se ha detectado una señal específica del objetivo.	Existe un elevado número de copias del ADN objetivo en las muestras, lo que causa la amplificación preferencial del ADN específico del objetivo.	No es necesario llevar a cabo ninguna acción.
No se ha detectado ninguna señal específica del objetivo en los pocillos de control negativo.	Se ha producido una contaminación por arrastre.	Repita el ensayo usando partes alícuotas frescas de todos los reactivos y limpie el equipo de pipeteado. Si el control negativo sigue mostrando que hay contaminación, repita el ensayo con un nuevo kit. Si el control negativo sigue mostrando que hay contaminación, póngase en contacto con el departamento de asistencia técnica de Applied Biosystems.
Se ha detectado una señal específica del objetivo en los pocillos de control negativo, pero no se ha detectado una señal de IPC.	Se ha producido una contaminación por arrastre y uno de los casos siguientes: • Existe un elevado número de copias del ADN objetivo en las muestras, lo que causa la amplificación preferencial del ADN específico del objetivo. • Se ha producido un problema con la amplificación del IPC.	Examine los elementos desconocidos para determinar si hay una señal de IPC. Si hay una señal de IPC en los pocillos desconocidos, entonces la amplificación del IPC no es un problema. Repita el ensayo usando partes alícuotas frescas de todos los reactivos y limpie el equipo de pipeteado.
No se ha detectado ninguna señal de IPC, pero se ha detectado una señal específica del objetivo en los pocillos de control positivo.	Existe un elevado número de copias del ADN objetivo en las muestras, lo que causa la amplificación preferencial del ADN específico del objetivo.	No es necesario llevar a cabo ninguna acción.

A StepOne™ y StepOnePlus™ Systems

Procesar las reacciones de 8 tubos en StepOne™ System

1. Coloque el MicroAmp® Fast 48-Well Tray (Cat. no. 4375282) en el bloque de placas de StepOne™ System.
2. Cargue las tiras de 8 tubos en posición horizontal. Por ejemplo, en la fila C, cargue una tira de 8 tubos en las columnas 1 a 8. Se recomienda una tira de 8 tubos como mínimo. No es necesario equilibrar las tiras de tubos en la bandeja.
3. Abra el documento del archivo de proceso correspondiente a la placa de reacción creada en "Crear un documento de archivo de proceso" en la página 25.
4. Inicie el proceso.

¡IMPORTANTE! Para evitar que se produzcan falsos positivos debido a material amplificado en su área de trabajo, no abra los tubos después de la amplificación.

Procesar las reacciones de 8 tubos en StepOnePlus™ System

1. Coloque el MicroAmp® 96-Well Tray for Veriflex™ Blocks (Cat. no. 4379983) en el bloque de placas de StepOnePlus System.
2. Cargue las tiras de 8 tubos en posición vertical. Por ejemplo, cargue las tiras de 8 tubos en las columnas 1 y 2 de las filas A a H en ambas columnas. La carga mínima recomendada es de dos tiras de 8 tubos (16 tubos), y se deben colocar en columnas adyacentes; por ejemplo, en las columnas 1 y 2. No es necesario equilibrar las tiras de tubos en la bandeja.
3. Abra el documento del archivo de proceso correspondiente a la placa de reacción creada en “Crear un documento de archivo de proceso” en la página 25.
4. Inicie el proceso.

¡IMPORTANTE! Para evitar que se produzcan falsos positivos debido a material amplificado en su área de trabajo, no abra los tubos después de la amplificación.

B Buenas Practicas de PCR

Evitar la contaminación y la amplificación no específica

Introducción

Los ensayos de PCR requieren prácticas de laboratorio especiales para evitar amplificaciones de falsos positivos. El nivel elevado de rendimiento y repetición de estos ensayos puede ocasionar la amplificación de una única molécula de ADN.

Buenas practicas de laboratorio para PCR

Cuando se preparan muestras para la amplificación de PCR/RT-PCR:

- Use guantes limpios y una bata de laboratorio limpia (no usados previamente durante la manipulación de productos amplificados o usados durante la preparación de la muestra).
- Cámbiese de guantes siempre que sospeche que están contaminados.
- Mantenga áreas de trabajo separadas, un equipo especial y suministros para:
  - Preparación y elaboración de la muestra.
  - Amplificación y análisis de los productos.
- No lleve los productos amplificados al área de preparación de la reacción.
- Abra y cierre todos los tubos de muestras con cuidado. Evite salpicar o rociar las muestras.
- Mantenga las reacciones y los componentes tapados tanto tiempo como sea posible.
- Utilice una pipeta de desplazamiento positivo o puntas de pipeta de barrera resistentes a los aerosoles.
- Limpie las mesas de trabajo del laboratorio y el equipo periódicamente con una solución con lejía al 10 % o DNA*Zap*™ Solutions (Cat. no. AM9890).

¡IMPORTANTE! Para evitar que se produzcan falsos positivos por contaminación cruzada:

- Prepare y cierre todos los tubos de control negativo y tubos de muestras desconocidas antes de pipetear el control positivo.
- No abra los tubos tras la amplificación.
- Use diferentes conjuntos de pipetadores al pipetear muestras de control negativo, desconocidas y de control positivo.

Sugerencias sobre la disposición de la placa

- Establezca una fila de separación entre los diferentes objetivos si hay suficiente espacio disponible.
- Coloque al menos un pocillo entre las muestras y los controles desconocidos si es posible.
- Establezca un pocillo de separación entre los controles negativos y positivos si es posible.
- Coloque juntos los replicados de una muestra para el mismo objetivo.

- Empiece por las muestras desconocidas y coloque controles al final de la fila o columna.
- Coloque controles positivos en una de las filas o columnas exteriores si es posible.
- Tenga en cuenta que los tapones están dispuestos en tiras de 8 o 12.

C

Seguridad

¡ADVERTENCIA! SEGURIDAD GENERAL. Si este producto se utiliza de alguna forma que no se especifica en la documentación del usuario, se pueden producir lesiones personales o daños en el instrumento o el dispositivo. Asegúrese de que todo aquel que utilice este producto haya recibido instrucciones sobre las prácticas de seguridad generales para los laboratorios y la información de seguridad facilitada en este documento.

- Antes de utilizar un instrumento o dispositivo, lea y comprenda la información de seguridad facilitada en la documentación de usuario suministrada por el fabricante del instrumento o dispositivo.
- Antes de manipular productos químicos, lea y comprenda las Hojas de Datos sobre Seguridad y use el equipo de protección personal apropiado (guantes, batas, protección ocular, etc.). Para obtener las Hojas de Datos sobre Seguridad, consulte la sección “Documentación y asistencia” de este documento.

Seguridad química

¡ADVERTENCIA! MANIPULACIÓN GENERAL DE PRODUCTOS QUÍMICOS. Para minimizar los peligros, asegúrese de que el personal del laboratorio lea y ponga en práctica las directrices generales sobre seguridad acerca del uso, la conservación y la eliminación de productos químicos suministradas a continuación, y consulte las Hojas de Datos sobre Seguridad pertinentes para conocer las precauciones e instrucciones específicas:

- Lea y comprenda las Hojas de Datos sobre Seguridad que proporciona el fabricante de los productos químicos antes de almacenar, manipular o trabajar con cualquier producto químico o material peligroso. Para obtener las Hojas de Datos sobre Seguridad, consulte la sección "Documentación y asistencia" de este documento.
- Minimice el contacto con productos químicos. Utilice un equipo adecuado de protección personal durante la manipulación de productos químicos (por ejemplo, equipo de protección para los ojos, guantes o vestimenta protectora).
- Minimice la inhalación de productos químicos. No deje abiertos los recipientes de productos químicos. Utilícelos únicamente con la ventilación adecuada (por ejemplo, una campana extractora de humo).
- Compruebe periódicamente la ausencia de fugas o derrames. Si se produce una fuga o un derrame, siga los procedimientos de limpieza del fabricante, tal y como se recomienda en la Hoja de Datos sobre Seguridad.
- Manipule los residuos químicos bajo una campana extractora de humo.
- Asegúrese de que se utilizan los contenedores de residuos primarios y secundarios. (Los contenedores primarios contienen los residuos inmediatos. Los contenedores secundarios contienen cualquier derrame o fuga del contenedor primario. Ambos contenedores deben ser compatibles con el material de residuo y deben cumplir los requisitos federales, estatales y locales sobre el almacenamiento en contenedores.)
- Después de vaciar el recipiente de residuos, ciérrelo bien con el tapón suministrado.
- Identifique (mediante análisis, si es necesario) los residuos generados por las aplicaciones, los reactivos y los sustratos utilizados en su laboratorio.
- Asegúrese de que los residuos se almacenan, transfieren, transportan y eliminan de acuerdo con todas las normativas locales, estatales/provinciales o nacionales.
- **¡IMPORTANTE!** Los materiales radiactivos o que impliquen un peligro biológico pueden requerir una manipulación especial, pudiéndose aplicar limitaciones en materia de eliminación.

Seguridad biológica

¡ADVERTENCIA! RIESGO BIOLÓGICO. Las muestras biológicas como, por ejemplo, tejidos, fluidos corporales, agentes infecciosos y sangre humana o de otros animales, pueden transmitir enfermedades infecciosas. Todo el trabajo se debe realizar en instalaciones que dispongan del equipamiento adecuado y con el equipo de seguridad apropiado (por ejemplo, dispositivos de contención física). El equipo de seguridad puede incluir también artículos para protección personal, como guantes, abrigos, batas, protectores de zapatos, botas, respiradores, protectores faciales, protección para los ojos o gafas de seguridad. Los trabajadores deben recibir formación de acuerdo con los requisitos de la institución o empresa y los requisitos legales aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente infecciosos. Siga todas las normativas locales, estatales/provinciales o nacionales aplicables. Las referencias siguientes proporcionan directrices generales sobre la manipulación de muestras biológicas en un entorno de laboratorio.

- U.S. Department of Health and Human Services, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL), 5th Edition, HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised December 2009; found at: **www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf**
- World Health Organization, Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition, WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11; found at: **www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf**

Documentación y asistencia

Obtener Hojas de Datos sobre Seguridad

Las Hojas de Datos sobre Seguridad están disponibles en **www.lifetechnologies.com/support**.

Nota: Para obtener las Hojas de Datos sobre Seguridad de productos químicos que no distribuye Life Technologies, póngase en contacto con el fabricante del producto químico.

Obtener certificados de análisis

El certificado de análisis proporciona información detallada sobre el control de calidad y la calificación de cada producto. Puede accederse a los certificados de análisis en nuestro sitio web. Vaya a **www.lifetechnologies.com/support** y busque el certificado de análisis por número de lote del producto, que aparece impreso en la caja.

Obtener asistencia

Para acceder a los servicios más recientes y obtener información sobre asistencia para todos los lugares, vaya a:

www.lifetechnologies.com/support o **www.lifetechnologies.com/foodsafety**

En el sitio web puede:

- Obtener números de teléfono y de fax de todo el mundo para contactar con los departamentos de asistencia técnica y de ventas.
- Buscar en las preguntas más frecuentes (FAQ).
- Enviar una pregunta directamente al departamento de asistencia técnica.
- Buscar documentos para el usuario, Hojas de Datos sobre Seguridad, secuencias y mapas vectoriales, notas de la aplicación, formulaciones, manuales, certificados de análisis, citas y otros documentos de apoyo del producto.
- Obtener información acerca de los cursos de formación para el cliente.
- Descargar actualizaciones y parches de software.

Asistencia sobre seguridad alimentaria

Sitio web: **www.lifetechnologies.com/foodsafety**

Dirección electrónica del servicio de asistencia: **foodsafety@lifetech.com**

Número de teléfono (dentro de Norteamérica): 1-800-500-6885

Número de teléfono (fuera de Norteamérica): Vaya a **www.lifetechnologies.com/contactus.html** y seleccione el país adecuado en el menú desplegable.

Garantía limitada del producto

Life Technologies Corporation o sus filiales garantizan sus productos conforme a lo expuesto en los términos y condiciones generales de venta de Life Technologies, que se encuentran en el sitio web de Life Technologies en **www.lifetechnologies.com/termsandconditions**. Si tiene alguna pregunta, póngase en contacto con Life Technologies en **www.lifetechnologies.com/support**.

Referencias

Association of Analytical Communities (AOAC). **www.aoac.org**. 2010. Accessed November 2010.

Association Française pour la Normalisation (AFNOR). **www.afnor-validation.com**. 2010. Accessed November 2010.

ISO 6579:2002 (E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

ISO 6887, parts 1 through 4. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.

ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.

NF EN ISO 6579:2002/Amd 1:2007: Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage

NF U47-100: norma francesa sobre el aislamiento y la identificación de *Salmonella* spp. en el medioambiente y en muestras de productos animales: "Recherche par l'isolement et l'identification de tout sérovar ou de sérovar(s) spécifié(s) de salmonelles dans l'environnement des productions animales" (Detección mediante siembra en estrías de todos los serotipos de *Salmonella* en muestras de producción primaria)